

УДК 615,468: 576,54

### **Создание биополимерных матриц для регенеративного тканегенеза\***

\* Работа выполнена при поддержке грантов для проведения инновационных исследований БГУ и РФФИ № 16-44-030854

© ***Цыбденова Арюна Пурбодоржиевна***

кандидат биологических наук  
Бурятский государственный университет  
Россия, Улан-Удэ, 670002, ул. Октябрьская, 36а  
E-mail: 8727127@mail.ru

© ***Дашинимаев Эрдэм Баирович***

кандидат биологических наук  
Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН  
Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26  
e-mail: dashinimaev@gmail.com

© ***Иванова Юлия Валентиновна***

кандидат медицинских наук  
Бурятский государственный университет  
Россия, Улан-Удэ, 670002, ул. Октябрьская, 36а  
E-mail: iul-999@yandex.ru

© ***Коллекер Александр Леонидович***

кандидат биологических наук  
Бурятский государственный университет  
Россия, Улан-Удэ, 670002, ул. Октябрьская, 36а  
E-mail: alexander.kolleker@gmail.com

© ***Хангажинов Александр Альбертович***

кандидат биологических наук  
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН  
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6  
E-mail: khangazhinov86@mail.ru

© ***Алексеева Эльвира Алексеевна***

кандидат медицинских наук, доцент  
Бурятский государственный университет  
Россия, Улан-Удэ, 670002, ул. Октябрьская, 36а  
E-mail: alecseevaelvira@mail.ru

© ***Хитрихеев Владимир Евгеньевич***

доктор медицинских наук, профессор  
Бурятский государственный университет  
Россия, Улан-Удэ, 670002, ул. Октябрьская, 36а  
E-mail: khitrikheev-ve@yandex.ru

Разработка и внедрение в клиническую практику новых биотехнологических аналогов тканей и органов, в частности эквивалентов кожи человека, призванных временно или постоянно заменять поврежденные или разрушенные ткани, остается актуальной задачей современной медицины. Одним из перспективных способов восстановления тканей может быть применение новых биоматериалов, например, биodeградируемых трехмерных биополимерных матриц. При помощи сочетания методик экстрагирования коллагена, формирования коллагеновых матриц, культивирования кератиноцитов человека линии HaCaT на коллагеновой подложке с последующей фиксацией и децеллюлированием детергентами создана белковая композиция, состоящая из двух основных компонентов — коллагена и ламинина базальной мембраны, находящихся в полном гистотипическом подобии со строением кожи человека. Полученные данные по восстановлению целостности кожного покрова у лабораторных животных с применением созданной репаративной тканеинженерной композиции, лишенной клеточной составляющей, позволяют рекомендовать конструкцию к внедрению.

**Ключевые слова:** регенеративная медицина; тканевая инженерия; заживление ран; матрикс; эквиваленты кожи; биополимеры; культуры клеток; кератиноциты; коллагены; ламинины.

### **Введение**

Одной из тенденций современной медицины является активное внедрение биологических полимеров, способных длительно выполнять необходимые функции или разлагаться на простые метаболиты и выводиться организмом за установленный срок без вреда для человека, что зачастую сопровождается образованием новых тканей. Глобальное старение населения и растущее число хирургических вмешательств для замены тканей и органов создают основу для устойчивого долгосрочного роста спроса на биосовместимые и биodeградируемые медицинские материалы [4]. Важнейшее и быстро развивающееся направление современной регенеративной медицины — применение клеточных технологий, например, в лечении острых и хронических ран, диабетических язв, ожогов. Задача клеточных технологий в этом случае заключается не только в трансплантации живых клеток в область дефекта, но и в полном восстановлении структуры и функции кожного покрова, в стимуляции регенеративных процессов и создании микроокружения для реализации потенциала собственных тканей и клеток. Для решения таких задач используют методы тканевой инженерии [8]. Тканевая инженерия призвана решить многие задачи регенеративной медицины, которая рассматривает вопросы улучшения продолжительности и качества жизни человека за счет восстановления утраченных структур и функций органов и тканей. Перспективным способом лечения и восстановления тканей может быть применение новых материалов, как на основе клеточных технологий, так и биodeградируемых матриц [2, 3, 5, 6].

Нами предлагается наряду с консервативными методами лечения заместительная терапия при помощи трехмерных матриц, гистотипически подобных тканям организма, с биологически активными агентами: клеточными производными — коллагенами и ламининами, способствующими структурообразовательной функции поврежденной области.

### Материалы и методы

Исследования проведены на 50 инбредных лабораторных крысах-самцах массой  $250 \pm 10,5$  г. (ЦКП «Виварий конвенциональных животных» ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Содержание, кормление, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялся в соответствии со строгим соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно правилам лабораторной практики Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 г.) в условиях вивария ИОЭБ СО РАН (г. Улан-Удэ). Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.1977). Проведено 2 блока исследований. Первый блок исследований в стерильных условиях (БМБ-II, «Ламинарные системы», Россия) включал: экстрагирование раствора коллагена I типа из сухожилий хвоста крыс 0,1% раствором уксусной кислоты (Лабтех, Россия), подбор условий полимеризации раствора коллагена в гелевую матрицу (1–5 мг/мл); оптимизацию условий культивирования immortalized кератиноцитов кожи человека линии HaCaT на коллагеновых матрицах ( $+37$  °C, 5% CO<sub>2</sub> (C-150, Binder, Германия), среда ДМЕМ с глутамином, 10% ФБС (ПанЭко, Россия), 10–40 тыс. клеток на см<sup>2</sup>); децеллюлирование трехмерной коллаген-ламининовой матрицы (EDTA; 0,1% TritonX-100, Sigma-Aldrich, США).

В ходе второго блока исследований с помощью гистологических и иммуногистохимических методов (первичные антитела на коллаген I типа, ламинин, панцитокератин, вторичные антитела с флуорохромом Alexa488; DAPI, VectaShield, VectorLab, США; флуоресцентная фотомикроскопия—EvosFLCellIS, ThermoFisherSc., США) была проведена идентификация матричных компонентов и оценка эффективности ранозаживления *in vivo* на моделях раневого дефекта кожного покрова у лабораторных животных (лоскутные полнослойные кожные раны площадью — 900 мм<sup>2</sup> на выбритом от шерсти участке спины при подкожном введении 250 мг/кг хлоралгидрата и наложении швов по периметру раны для вторичного натяжения). Для забора материала животных выводили из эксперимента на 4, 7, 14, 21 сутки для оценки особенностей репаративной регенерации в различные фазы раневого процесса (общий наркоз, декапитация) в трех опытных группах (1 — группа животных, которым на рану через 24 часа наносилась коллаген-ламининовая пленка; 2 — группа животных, которым на рану через 24 часа накладывалась желатиновая гемостатическая губка (Spongostan, Ferrosan, Дания); 3 — группа животных, на раны, которым не привносился ранозаживляющий материал; 4 — группа животных, не получавших каких-либо воздействий).

Полученный материал раневой поверхности кожного покрова фиксировался в 10%-ном формалине с последующим обезвоживанием с касторовым маслом, заливкой в парафин и окраской гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия) срезов, подготовленных на ротационном микротоме (SRM200, Sakura, Япония).

### Результаты и обсуждение

Проведенные исследования *in vitro* позволили с помощью клеточных технологий и применения биполимерного субстрата получить данные о возможности образования устойчивой тканеинженерной гистотипической композиции на основе экстрагированного в виде гелевой пленки коллагеновой матрицы с децеллюлированной ламининовой поверхностью (фото 1, 2). Иммуногистохимический флуоресцентный анализ идентифицировал экспрессию композитных белков — коллагена I типа и ламинина, а также панцитокератина — маркера эпителиальных клеток (фото 3).

Таким образом, предлагаемый вариант трехмерной матрицы представляет собой белковую композицию, состоящую из двух основных компонентов, — коллагена первого типа и ламинина базальной мембраны, находящихся в полном гистотипическом подобии со строением кожи человека. Семейства белков коллагенов и ламининов являются двумя самыми распространенными типами белков кожного покрова человека. Коллаген является основой мезенхимного компонента дермы кожи, обеспечивая ее механическую прочность и упругость. Ламинин является основой любых базальных мембран органов, в том числе и базальной мембраны кожи [1, 7].

Контролируемые исследования динамики течения моделируемого раневого процесса в течение 21 суток показали преобладание клеток воспалительного или пролиферативного ряда и особенности клеточных дифферонов в зависимости от фазы раневого процесса.

У животных 1, 2, 3 групп через сутки после моделирования кожной раны при макросъемке отмечали повреждение эпидермиса, дефект был заполнен некротизированными массами. С помощью гистологических методов в области дермы, образующей края и дно раны, наблюдали выраженную лейкоцитарную инфильтрацию; между волокнами отмечали явления отека. Сосуды дермы выявляли популяцию дегранулированных тучных клеток, расширенные сосуды дермы, с выраженным стазом эритроцитов. Результаты исследований, полученные на модели лоскутной кожно-мышечной раны, свидетельствуют о том, что в группах с применением коллаген-ламининовой матрицы на 7, 14 сутки ускорялась динамика сокращения площади раневых дефектов. Рост грануляционной ткани наблюдали со дна раны, в новообразованиях соединительной ткани отмечали васкуляризацию.

Во 2 группе отмечали развитие грануляционной ткани, начало эпителизации раневого дефекта. В этот период исследования у животных 3 группы раневая поверхность была покрыта струпом в виде тонкого пласта, часто фрагментированным, рыхло спаянным с подлежащими тканями. При анализе внешнего состояния раневых дефектов и по данным гистологического анализа на 21 сутки у животных 1 группы отмечали закрытие раны, эпителизацию с краев. У животных 2 группы толщина эпидермиса приближалась к уровню интактного, но преобладали раны, в которых эпидермис не полностью восстановил дефект. В 3 группе наблюдали, что целостность кожных покровов частично не восстановлена, направление и толщина коллагеновых волокон отличались разнообразием — это указывает на незрелость тканей [1]. В глубине дермы отмечали очаги инфильтрации клетками воспалительного ряда.

Полученные данные по восстановлению целостности кожного покрова свидетельствуют о том, что созданная репаративная композиция обладает высокой эффективностью ранозаживления, благодаря направленному росту регенерирующей ткани с поддержанием процессов васкуляризации. Разработанный биосовместимый коллаген-ламининовый ранозаживляющий материал, основанный на комбинации полимерной подложки и продукта синтеза кератиноцитов человека, при этом лишенный клеточной составляющей, отличается сравнительной простотой изготовления, длительностью срока хранения, что позволяет рекомендовать конструкцию к внедрению.

#### *Литература*

1. Алексеева Н. Т. Морфологические особенности раневого процесса в коже при региональном лечебном воздействии: дис. ... д-ра мед. наук. 2015. 327 с.
2. Григорян А. С., Кругляков П. В. Применение в тканевой инженерии крупных сосудов трансплантантов на основе аутогенных моноклеарных клеток костного мозга // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009. Т. IV. №3. С. 37–41.
3. Капорская А. Н., Сеницына Т. Ю., Азизов И. Г. Создание биополимерных матриц для регенеративного тканегенеза // Актуальные вопросы биомедицинской инженерии: материалы VI Всерос. науч. конф. молодых ученых. 2017. С. 39.
4. Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития, аналитический обзор компании «FrostandSullivan». 2014. 69 с.
5. Панарин Е. Ф., Нудьга Л. А., Петрова В. А., Бочек А. М., Гофман И. В., Лебедева М. Ф., Блинова М. И., Спичкина О. Г., Юдинцева Н. М., Пинаев Г. П. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов хитина и хитозана // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009. Т. IV. №3. С. 42–46.
6. Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А., Барановский Ю. Г., Каракулькина О. А., Барановский А. Г. Оптимизация типа коллагена каркаса в биоинженерных конструкциях для заживления язв кожи с учетом эмбриогенеза кожи у эмбрионов человека // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2014. № 5. С. 107–110.
7. Gould L. J. Topical Collagen-Based Biomaterials for Chronic Wounds: Rationale and Clinical Application. // Advances in wound care (New Rochelle). 2016. Vol. 5. №1. P. 19–31.
8. Meleshina A. V., Bystrova A. S., Rogovaya O. S., Vorotelyak E. A., Vasiliev A. V., Zagaynova E. V. Tissue-engineered skin constructs and application of stem cells for creation of skin equivalents (review) // Sovremennye tehnologii v medicine. 2017 9(1) P. 198–218.

### **Developing Biopolymeric Scaffolds for Regenerative Tissue Genesis**

***Aryuna P. Tsybdenova***

Cand. Sci. (Biology)

Buryat State University

36a Oktyabrskaya St., Ulan-Ude 670002, Russia

E-mail: 8727127@mail.ru

***Erdem B. Dashinimaev***

Cand. Sci. (Biology)

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences

26 Vavilova St., Moscow 119334, Russia

E-mail: dashinimaev@gmail.com

***Julia V. Ivanova***

Cand. Sci. (Biology)

Buryat State University

36a Oktyabrskaya St., Ulan-Ude 670002, Russia

E-mail: iul-999@yandex.ru

**Alexander L. Kolleyer**

Cand. Sci. (Biology)

Buryat State University

36a Oktyabrskaya St., Ulan-Ude 670002, Russia

E-mail: alexander.kolleyer@gmail.com

***Alexander A. Khangazhinov***

Cand. Sci. (Biology)

Institute of General and Experimental Biology SB RAS

6 Sakhyanovoi St., Ulan-Ude 670047, Russia

E-mail: khangazhinov86@mail.ru

***Elvira A. Alekseeva***

Cand. Sci. (Medicine), Assistant Prof.

Buryat State University

36a Oktyabrskaya St., Ulan-Ude 670002, Russia

E-mail: alekseevaelvira@mail.ru

***Vladimir E. Khitrikheev***

Dr. Sci. (Medicine), Prof.

Buryat State University

36a Oktyabrskaya St., Ulan-Ude 670002, Russia

E-mail: khitrikheev-ve@yandex.ru

Development and introduction of new biotechnological analogues of tissues and organs into clinical practice, in particular human tissue-engineered skin equivalents, designed for temporal or permanent replacement of damaged or destroyed tissue, remains an urgent problem of modern medicine. One of the most promising approaches for tissue reconstitution is an application of bioderived materials such as biodegradable 3D matrixes. Combining collagen extraction, gelation of collagen as flat matrixes, culturing HaCaT keratinocytes on the formed matrixes with subsequent fixation and decellularization allowed to develop nonliving acellular dermo-epidermal skin analogues consisting of two main components –collagen and laminin. The in vivo evaluation of the skin scaffolds transplanted onto full-thickness skin wounds created on the back of rats showed enhanced wound healing. a new protein scaffold consisting of two components — collagen and laminin of basal membrane mimicking the structure of human skin is proposed for implementation in regenerative medicine.

**Keywords:** regenerative medicine; tissue engineering; wound healing; matrix; tissue-engineered skin; skin equivalents; biopolymers; cell culture; keratinocytes; collagen; laminin.